

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390228

研究課題名(和文) MuSK抗体陽性重症筋無力症の新治療法を可能にする病態メカニズムの研究

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanisms and developing new therapies of myasthenia gravis

## 研究代表者

重本 和宏 (SHIGEMOTO, KAZUHIRO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：40284400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：1. 抗MuSK(muscle-specific kinase)抗体で発症する重症筋無力症(MG)は従来の治療法に対して難治性の症例が多く、急速に筋萎縮に至る症例もあり、発症機序が抗AChR抗体で発症するMGとは全く異なる。本研究で、MuSK-MGの疾患モデルマウスに対してラパマイシンが有効であることを明らかにした。  
2. 本研究より、抗LRP4抗体でMGを発症するマウスモデルを作成することに成功した。LRP4は成体の神経筋シナプスの構造維持において必須の分子であり、LRP4の機能抑制が神経筋シナプスの変性を介して筋力低下を引き起こすことが証明された。

研究成果の概要(英文)：1. Some patients with myasthenia gravis (MG) caused by antibodies against muscle-specific kinase (MuSK; MuSKMG) apparently do not respond to immunosuppressive therapy and rapidly progress to life-threatening muscle atrophy. In addition, long-term administration of corticosteroids, which are first-line treatment of MG, is frequently responsible for severe adverse effect. We found that rapamycin treatment suppressed occurrence of MG-like phenotypes, including weight loss and significant decrement of compound muscle action potentials with the histological evidence. Rapamycin may be useful as an immunomodulation drug of MG.  
2. We generated a murine model of MG caused by anti-Lrp4 antibodies via active immunization of LRP4 protein, providing the evidence for the pathogenicity of anti-Lrp4 antibodies. We expect our approach and the model will be of value to the MG research community, helping to accelerate development of therapeutic candidates for clinical translation.

研究分野：神経学

キーワード：重症筋無力症 神経筋シナプス 自己抗体 MuSK 疾患モデル LRP4

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会を背景に重症筋無力症 (myasthenia gravis:MG) の患者数が増加している。MuSK(muscle-specific kinase)抗体で発症する MG は、従来の治療法に対して難治性の症例が多く、急速に筋萎縮に至る症例もある。MuSK-MG の発症メカニズムの研究成果に基づく有効な治療薬・治療法が求められる。

(2)MG 患者から、MuSK やアセチルコリン受容体 (AChR) と同じ神経筋シナプスの筋側に発現する LRP4 蛋白に対する自己抗体が、新たに発見された。この自己抗体で MG が本当に発症するかどうかについて証明する必要がある。

## 2. 研究の目的

(1)自己免疫疾患の MG は早期診断と免疫治療を行ない患者の QOL 向上を図ることが推奨されるが、経口ステロイドの長期投与は QOL を阻害する症例が少ない。特に MuSK-MG は、従来の治療法に対して難治性の症例が多く、急速に筋萎縮に至る症例もあることや、発症機序が AChR-MG とは全く異なる。本研究では、我々が開発した MuSK-MG の疾患モデルマウスを使い MuSK-MG 患者に対して有効な治療法を探索する。その効果を詳細に評価して臨床応用へ展開することを目的とする<sup>1,2)</sup>。

(2) 申請者らは agrin と結合して MuSK を活性化する LRP4 の細胞外ドメインのリコンビナントタンパクを培養細胞で産生して精製した後、マウスに免疫して MG を発症することに成功した。LRP4-MG の疾患モデルは 2013 年に米国の Mei のグループから最初の報告がされているが<sup>3)</sup>、典型的な MG モデルとは言えず抗 LRP-MG 抗体が MG の原因となるかどうかは、依然論争がある。さらに、LRP4-MG 疾患モデルを確立することができれば病態解明に併せて有効な治療法を開発することが可能となる。そこで、本研究においては MuSK-MG に加えて LRP4-MG モデルマウスの病態も MuSK-MG と同じ手法(筋電図、免疫組織染色など)を用いて明らかにする<sup>1,2)</sup>。

## 3. 研究の方法

(1)精製した MuSK 蛋白を米国ジャクソン研究所から入手した A/WySnJ マウスの 8 週齢のメスに免疫して、抗 MuSK 抗体によって発症する動物モデルを作成した<sup>1,2)</sup>。抗原はラットの筋細胞 mRNA から細胞外ドメインの cDNA を PCR で増幅し発現ベクター内で His-tag とさせ、293T 細胞にトランスフェクションしてコンビナント蛋白を発現作成した。リコンビナント蛋白は His-tag 結合レジンで精製した。リコンビナント蛋白を、補体欠損マウス一匹あたり 20 µg をアジュバントと一緒に 2 週間おきに免疫して、体重変化(減少)を経時的に測定して発症進行をモニターする。ラパマイシンをエタノールに溶解して 20 mg/mL とし、その後 5 % tween80/5 %

ポリエチレングリコール/PBS を用いて 0.8 mg/mL に希釈した。0.22 µm フィルターにて濾過したのち、5 mg/kg となるように、2 回目の免疫日から開始して 1 週間に 5 日の割合でマウスに腹腔内投与した (n=7)。コントロールとするマウスには 5 % Tween80/5 % ポリエチレングリコール/PBS を 0.22 µm フィルターにて濾過したのち同様の方法で腹腔内投与し、vehicle 投与群(n=8)とした。動物実験計画は実験施設(東京都健康長寿医療センター研究所)で承認された方法に従って行った。

ラパマイシンの効果判定は、体重の変化、抗 MuSK 抗体値を ELISA 法で測定する、筋電図を測定する、神経筋シナプスの組織染色、筋力測定を行った。各測定値は統計により解析を行った。

(2)購入した LRP4 の cDNA クローンから細胞外ドメインの配列 C 末端に His-tag を付加した LRP4 cDNA 配列を PCR でクローニングし、発現ベクターに挿入して Expi293F 細胞にトランスフェクションした。数日後に細胞の培養メディウムを回収し、Ni-sepharose を用いてリコンビナント LRP4 タンパクを精製した。精製したリコンビナントタンパクを抗原とし、補体欠損マウス一匹あたり 10 mg をアジュバントでエマルジョン化して 2 ~3 週間毎に免疫注射した。対照群には PBS をアジュバントでエマルジョン化して同様に注射した。動物実験計画は実験施設(東京都健康長寿医療センター研究所)で承認された方法に従って行った。

MG を発症しているかどうかの判定は、体重の変化、抗 LRP4 抗体値を ELISA 法で測定する、筋電図を測定する、神経筋シナプスの組織染色、筋力測定を行った。

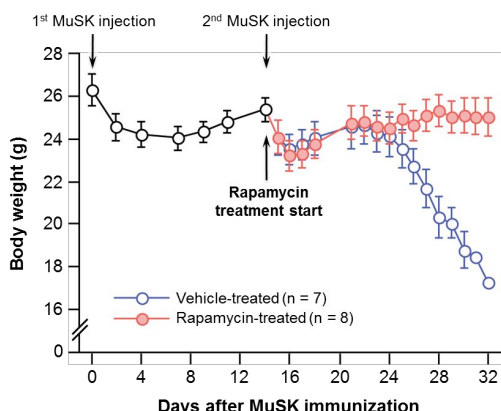
抗 LRP4 抗体が MuSK 機能を抑制するかどうか、発症したマウスの血清を使い invitro での AChR 凝集実験で評価した。C2C12 筋芽細胞を播種し、筋管細胞の形成を誘導した。分化誘導 3 日後、リコンビナント agrin (1 nM) による刺激を行う 30 分前に LRP4 免疫マウスの血清 (50 倍希釈) を培養系に添加し、AChR の凝集形成に及ぼす影響を検討した。Agrin 刺激 15 時間後に Alexa488 標識 -bungarotoxin を添加して AChR 凝集を染色し、固定後に蛍光顕微鏡下で観察した。また、agrin 刺激 13 時間後にマウス血清 (50 倍希釈) を添加し、既に形成された AChR 凝集に及ぼす影響を検討した。

各測定値は統計により解析を行った。

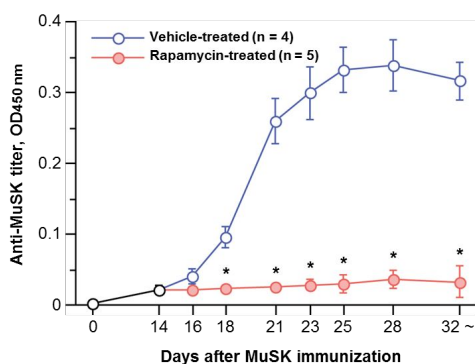
## 4. 研究成果

(1)MuSK-MG モデルマウスは、2 回目の MuSK 抗原注射から 2 週間程度経過すると、MuSK-MG 発症に伴い、体重が継時的に減少していく。一方、ラパマイシン投与マウス群においては、

MuSK-MG 発症に伴う体重減少が vehicle 投与マウス群と比較して有意に抑えられており、ラパマイシン投与による健康状態の改善が認められた(下図).

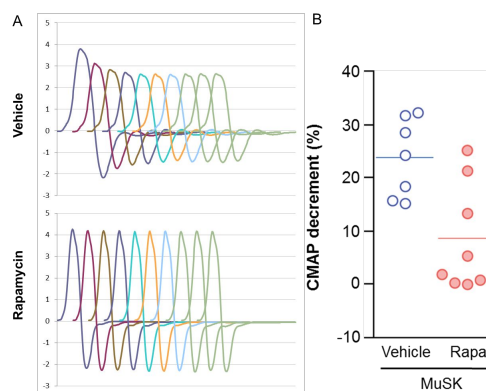


マウスに抗原注射した場合、2 度目以降の抗原注射ではブースト効果により、MuSK 抗体価が大きく上がる。ラパマイシン投与マウス群では、MuSK 抗体価の上昇が、vehicle 投与マウス群と比較してラパマイシン投与開始後 4 日目から有意に抑えられており、MuSK タンパク質に対する免疫応答がラパマイシン投与により抑制された(下図)。



MG を発症したマウス(患者)の筋電図測定で変化が生じる機序は以下の通りである。筋支配する神経に連続して電気刺激を与えると、神経終末から分泌される ACh が減少するが、健常者の筋では十分な AChR が存在しているため、すべての筋が閾値に至り収縮することができる。しかし、重症筋無力症発症マウスにおいてはシナプスの AChR 量が減少しているため、ACh 量が減少により閾値に達することができず収縮しない筋線維が出てくる。その結果、筋に短時間で連続して刺激を与えると、複合筋活動電位(CMAP) 振幅は 10% 以上の顕著な漸減反応を示す。今回の実験において、vehicle 投与マウスでの CMAP 振幅では漸減反応を示さなかったが、ラパマイシン投与マウスでは CMAP の減衰率の有意な低下が認められ、神経筋伝達能の低下が抑えられていることが明らかとなった(右上図)。

重症筋無力症を発症すると、自己抗体により神経筋シナプスの維持メカニズムが障害され形



態異常が観察されるようになる。2 回目の免疫注射から約 2 週間後の vehicle 投与マウス群のうち、解析した 3 匹のマウスの全てのヒラメ筋において、シナプス筋側の AChR 凝集の散乱と明確な減少を認め、シナプスの運動神経終末の形態異常が認められた。対して、ラパマイシン投与マウスでは解析した 4 匹のマウス全てのヒラメ筋において、ポストシナプスに多数の AChR 凝集が明確に認められ、運動神経終末の形態異常は観察されなかった。

以上の結果から、ラパマイシンが MuSK-MG の症状を抑える作用を有し、MuSK-MG の新たな治療薬として有用である可能性が示された。

(2) LRP4 タンパクを 2 回または 3 回免疫したマウスは対照群のマウスと比較して体重の急激な減少と筋力の顕著な低下を認めた。また、体重減少に伴い、姿勢保持や歩行動作が困難となるマウスが出現した。LRP4 蛋白を免疫して発症したマウスの筋電図を測定すると、3 Hz の反復神経刺激での第 2 刺激後の CMAP から振幅の急激な低下を示し MG 患者でも観察される典型的な漸減反応のパターンである。第 1 刺激後の振幅と最小の振幅を比較すると、異常と見なされる 10% 以上の減衰を示し、筋が易疲労状態にあることを示した。一方、対照群のマウスでは活動電位の振幅低下は認めなかった。また、発症したマウスでは刺激周波数に依存した CMAP 振幅の減衰率の増加が認められた。従って、LRP4 免疫マウスの筋力低下は、神経筋シナプスの刺激伝達が抑制されたことに起因していると考えられる。

LRP4-MG マウスの神経筋シナプスの病理学的解析の際は、シナプス後膜に存在する AChR 凝集の染色強度が顕著に低下しており、AChR の発現が減少していることがわかった。さらに、運動神経終末の染色面積の減少していることから神経筋シナプス全体の構造が縮小していることが明らかとなった。

LRP4-MG マウスの血清中の抗 LRP4 抗体が顕著に上昇しており、LRP4-mCherry を細胞膜表面に発現させた培養細胞に特異的に結合した。C2C12 筋管細胞の培養系に agrin を添加すると、agrin と結合した LRP4 が MuSK のチロシンキナーゼ活性(自己のチロシン残基

をリン酸化する)を活性化し、筋管細胞の表面上に AChR の凝集を誘導する。Agrin 刺激前に抗 LRP4 血清を培養系に添加すると、MuSK のリン酸化が抑制され、対照群のマウス血清と比較して AChR 凝集の減少が認められたことから、抗 LrRP 抗体は MuSK の活性化を抑制することで AChR の凝集形成を抑制することが示された。また、agrin 刺激によって AChR 凝集を誘導した後に抗 LRP4 血清を添加しても凝集の減少が認められたことから、自己抗体は AChR 凝集の維持も抑制することが *in vitro* で示された。

本研究より、抗 LRP4 抗体で MG を発症するマウスモデルを作成することに成功した。LRP4 は成体の神経筋シナプスの構造維持において必須の分子であり、LRP4 の機能抑制が神経筋シナプスの変性を介して筋力低下を引き起こすことが証明された。

#### <引用文献>

Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N, Shigemoto K. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 180: 798-810, 2012.

Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K. 3,4-diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 245: 75-8, 2012.

Shen C, Lu Y, Zhang B, Figueiredo D, Bean J, Jung J, Wu H, Barik A, Yin DM, Xiong WC, Mei L. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J Clin Invest* 123:5190-202, 2013

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Mori S, Koshi K, Shigemoto K. The important role of the neuromuscular junction in maintaining muscle mass and strength. *J Phys Fitness Sports Med* 3: 111-114, 2014. (査読無し)
2. 重本和宏: 筋萎縮(サルコペニア)における代謝変換のメカニズムの役割 *実験医学*, Vol.32 No.9, 1366-71, 2014. (査読無し)
3. 重本和宏: 筋萎縮(サルコペニア) *医学のあゆみ* 248、691-695, 2014. (査読無し)
4. 森 秀一, 高嶋 留美, 小西 哲郎, 重本和宏. 動物モデルによる重症筋無力症の

病態機序の解明. *神経内科* 80:

475-483, 2014. (査読無し)

5. 重本和宏, 森秀一, 本橋紀夫:サルコペニアに関する基礎筋肉学. *整形・災害外科* 58, 145-153, 2015. (査読無し)
6. 重本和宏, 森秀一, 本橋紀夫:サルコペニアと神経筋シナプス. *最新医学* 70,69-73, 2015. (査読無し)
7. Mori, S., Kishi, M., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: 3,4-diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J.Neuroimmunol.* 245, 75-78, 2012. (査読有り)
8. Miyazaki, T., Iwasawa, M., Nakashima, T., Mori, S., Shigemoto, K., Nakamura, H., Katagiri, H., Takayanagi, H. and Tanaka, S.: Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *J.Biol.Chem.* 287, 37808-23, 2012. (査読有り)
9. Mori, S. and Shigemoto, K.: Mechanisms associated with the pathogenicity of antibodies against muscle-specific kinase in myasthenia gravis. *Autoimmun.Rev.* 12, 912-917, 2013. (査読有り)
10. 重本和宏, 福永大地, 森秀一: 筋肉の老化. *Clin.Calcium* 23, 23-28, 2013. (査読無し)
11. 森 秀一, 重本 和宏: 神経筋接合部の維持機構と筋萎縮. *医学のあゆみ* 244, 696-703, 2013. (査読無し)
12. 宮崎 剛, 森 秀一, 重本 和宏: サルコペニア発症のメカニズム. *腎と骨代謝* 26, 99-107, 2013. (査読無し)
13. 重本和宏, 越勝男, 森秀一: サルコペニアの病因と疾患メカニズム. *アンチエイジング医学* 9, 536-540, 2013. (査読無し)

[学会発表](計 13 件)

1. 重本和宏:サルコペニアと代謝制御の臨床. 第 87 回日本内分泌学会学術総会 福岡, 4月24-26日, 2014年
2. 森秀一, 重本和宏: 神経筋シナプスの維持メカニズムの解明とサルコペニア研究の展開. 第 67 回日本体力医学会大会, 岐阜, 2012.9.14-16, 2014年
3. 重本和宏:サルコペニアの基礎と臨床. 第 69 回日本体力医学会, 長崎, 9月20日, 長崎, 2014年.
4. 森秀一, 越勝男, 村瀬尚哉, 重本和宏: 抗 LRP4 抗体による重症筋無力症の動物

- モデル作成と病態機序の解明. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.20-24
5. Shigemoto K.: Preclinical models of myasthenia gravis: MuSK model, The preclinical workshop on MG models. NIH Bethesda, USA.2014.9.24-25
  6. 重本和宏、森秀一、福永大地: Fiber specific studies in muscle atrophy with aging mice, 第 1 回サルコペニ・アフレイル研究会、10 月 19 日、東京、2014 年
  7. Mori S., Takashima R, Shigemoto K. Generation of experimental model of myasthenia gravis with antibodies against LRP4. Society for Neuroscience 2014, 11.15-19. Washington, D.C.2014
  8. 森秀一、久保幸穂、重本和宏: 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症に關与する分子機序の解明. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013.5.29-6.1
  9. Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: A murine model of myasthenia gravis with MuSK antibodies; effect of genetic background. Myasthenia 2013, Paris, 2013.7.1-2
  10. Mori, S., Kubo, S., Kishi, M., Konishi, T. and Shigemoto, K.: Elucidation of pathogenic mechanism of myasthenia gravis with MuSK antibodies using a novel murine model. 15th International congress of immunology, Milan, 2013.8.22-27
  11. Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: A novel murine model of myasthenia gravis with MuSK antibodies. 12th International conference on myasthenia gravis and related disorders, New York, 2012.5.21-23
  12. Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K.: Examination of the treatment of myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies using an experimental autoimmune animal model. 12th International conference on myasthenia gravis and related disorders, New York, 2012.5.21-23
  13. Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Kishi, M. and Shigemoto, K.: Effectiveness of 3,4-diaminopyridine to symptomatic treatment of a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 2012.9.18-21

〔図書〕(計 2 件)

1. 重本和宏: 筋肉 (サルコペニア) p34-49, 「老化の生物学」, 石井直明・丸山直記編, 化学同人, 2014 年.
2. 重本和宏: Q.9 診断のためのバイオマーカーについて教えてください. サルコペニア 24 のポイント 高齢者への適切なアプローチをめざして, 47-51, フジメディカル出版 2013 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

名称: 加齢または筋萎縮の診断用バイオマーカー

発明者: 重本和宏

権利者: 東京都健康長寿医療センター

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/060671

出願年月日: 平成 27 年 4 月 3 日

国内外の別: 国外

名称: 筋幹細胞又は筋芽細胞, 及びそれを用いた代謝変換に關与する物質のスクリーニング, 並びにスクリーニング方法によって得られた物質を含む医薬組成物

発明者: 重本和宏

権利者: 東京都健康長寿医療センター

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/078366

出願年月日: 平成 26 年 10 月 24 日

国内外の別: 国外

名称: 加齢または筋萎縮の診断用バイオマーカー

発明者: 重本和宏

権利者: 東京都健康長寿医療センター

種類: 特許

番号: 特願 2014-77086

出願年月日: 平成 26 年 4 月 3 日

国内外の別: 国内

名称: 筋幹細胞又は筋芽細胞, 及びそれを用いた代謝変換に關与する物質のスクリーニング, 並びにスクリーニング方法によって得られた物質を含む医薬組成物

発明者: 重本和宏

権利者: 東京都健康長寿医療センター

種類: 特許

番号: 特願 2013-221037

出願年月日: 平成 25 年 10 月 25 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

[http://www.tmghig.jp/J\\_TMIG/kenkyu/team/undokiigaku.html](http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/undokiigaku.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

重本和宏 (SHIGEMOTO Kazuhiro)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長  
研究者番号: 40284400

### (2) 研究分担者

森 秀一 (MORI Shuuichi)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
研究者番号: 30508677

### (3) 研究分担者

枝松 緑 (EDAMATSU Midori)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
研究者番号: 10735343

### (4) 研究分担者

宮崎 剛 (MIYAZAKI Tsuyoshi)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
研究者番号: 50376480

### (5) 研究分担者

越 勝男 (KOSHI Katsuo)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
研究者番号: 20710057

### (3) 連携研究者

小西 哲郎 (KONISHI Tetsuro)  
独立行政法人国立病院機構宇多野病院・神経内科・院長  
研究者番号: 50426508